

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА В НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМЕ И В ВИДЕ ЦИТРАТА, ПОЛУЧЕННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

Белецкая Э.Н., Онул Н.М.

Кафедра общей гигиены Государственного учреждения «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины», г. Днепропетровск, Украина

В современных условиях техногенной нагрузки на организм человека и среду его обитания, проблема химического загрязнения является ведущей в нашей стране и в мире в целом [7]. При этом, по определению экспертов ВОЗ, лидирующие позиции занимает загрязнение окружающей и внутренней среды тяжелыми металлами, в первую очередь – свинцом, который отличается высокой токсичностью, способностью к биокумуляции и медленному выведению из организма [10, 12]. Многолетними исследованиями сотрудников кафедры общей гигиены ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины» установлено, что в условиях техногенных биогеохимических провинций биосубстраты системы «мать - плацента - плод» содержат повышенное количество свинца, которое детерминирует развитие осложнений беременности, родов и послеродового периода [1].

Наряду с обычными формами тяжелых металлов, благодаря научно-техническому прогрессу и развитию нанотехнологий, в современную жизнь активно внедряются новые, наноразмерные формы металлов, формируя новый, «искусственный» фактор, влияющий на экологическую систему и здоровье человека. Преимущества наночастиц, которые отличают их от макродисперсных форм веществ - малый размер, структура, химический состав и большая площадь поверхности позволяют активно их использовать во всех отраслях человеческой деятельности. Но, с другой стороны, вышеуказанные особенности делают наночастицы потенциально опасными для живых организмов, поскольку обуславливают новые, не характерные для обычных форм металлов свойства [6].

В последние годы удельный вес токсикологических исследований по изучению влияния наночастиц на объекты окружающей среды и здоровье человека существенно возрос. Особенно актуальными эти исследования представляются в области изучения их воздействия на одну из наиболее чувствительных систем организма – репродуктивную [2, 12]. Но, несмотря на существующие данные по эмбриотоксичности свинца, а также достаточно активные исследования по влиянию наноматериалов на организм, они почти не затрагивают вопросов влияния низких доз металла на эмбриональное развитие, а

сравнительные аспекты токсического действия органических и неорганических его форм, полученных с использованием нанотехнологий, практически отсутствуют. Поэтому экспериментальные работы по данному направлению являются чрезвычайно актуальными на сегодняшний день.

Цель исследования - выявить особенности эмбриотоксического действия свинца в неорганической форме и в виде цитрата, полученного с использованием нанотехнологий, в условиях лабораторного эксперимента.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на половозрелых самках крыс линии Wistar весом 170-200 г. Выбор объектом исследования именно этих лабораторных животных обусловлен тем, что у крыс и человека одинаковый гемохориальный тип плаценты, а также в них низкий уровень спонтанных пороков развития [2].

В эксперименте использованы методические подходы, отвечающие современным международным требованиям по проведению токсикологических экспериментов с использованием позвоночных животных в соответствии с Европейской конвенцией (Страсбург, 1986). Крыс содержали в оптимальных условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище в соответствии с существующими требованиями [4]. После двенадцатидневного периода карантина животных с устойчивым ритмом эстрального цикла в стадии проэструс и эструс спаривали с интактными самцами по схеме 2:1. Первый день беременности определяли по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках [2].

В экспериментальной модели использовали растворы ацетата свинца и цитрата свинца, полученного с применением нанотехнологий (Украинский государственный НИИ нанобиотехнологий и ресурсосохранения, г. Киев) в дозе 0,05 мг/кг по свинцу. Дозы исследуемых металлов увеличены в 10 раз по сравнению с уровнем их суммарного суточного поступления (по отношению к контрольной группе животных) в соответствии с требованиями токсикологических исследований, что составляет около $1/30000$ LD₅₀ и соответствует порогу токсичности. Самок с датированным сроком беременности распределили на 3 группы: 2 экспериментальные (1 - ацетат свинца, 2 – цитрат свинца) и одна – контрольная (по 10 крыс в каждой группе). Отбор самок крыс в контрольную и опытные группы проводился в произвольном порядке с формированием однородных по средней массе групп животных. Исследуемые вещества вводили беременным самкам с 1 по 19 день беременности внутрижелудочно через зонд один раз в сутки, в первой половине дня, перед кормлением. Крысам контрольной группы в эти же сроки вводили растворитель,

который использовался при приготовлении агента влияния, т.е. дистиллированную воду. На 20 день животных выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом.

О возможном негативном воздействии исследуемых веществ на эмбриональное развитие судили по их влиянию на показатели эмбриональной смертности (общей, до- и постимплантационной), количеству желтых тел беременности, живых плодов на 1 самку и соотношению полов в помете, внешних пороках развития, соматометрическим показателям плодов – массе и диаметре тела, краниокаудальном размере как у плодов в целом, так и отдельно для самцов и самок.

Все полученные в работе цифровые данные обрабатывали компьютерными программами Microsoft Excel, Statistica 10. Тестирование выборок на их различие и на соответствие нормальному закону распределения проводилось с использованием статистического пакета Statistica 10. Другие расчеты и оформление графического материала проводилось в электронных таблицах Microsoft Excel. Различия считали достоверными при $p < 0,05$, вероятными при $0,05 < p < 0,1$.

Результаты и их обсуждение. Как видно из таблицы 1, индекс плодовитости самок, а также количество желтых тел беременности существенно не отличаются у животных опытных и контрольной групп и соответствуют данным литературы [2, 3]. В то же время, введение крысам ацетата свинца на протяжении всего периода беременности обуславливает достоверное снижение количества живых плодов в помете - $7,50 \pm 0,53$ (рис. 1) при отсутствии

Таблица 1

Показатели эмбрионального развития в экспериментальных и опытной группах ($M \pm m$)

Показатели	Группа животных		
	контрольная	ацетат свинца (1 группа)	цитрат свинца (2 группа)
Индекс плодовитости, ед.	0,8	0,9	0,8
Число живых плодов на 1 самку	$9,0 \pm 0,4$	$7,50 \pm 0,53^*$	$8,63 \pm 0,80$
Количество желтых тел на 1 самку	$10,13 \pm 0,53$	$9,88 \pm 0,53$	$10,13 \pm 0,66$
Общая эмбриональная смертность, %	$11,11 \pm 4,43$	$24,05 \pm 1,33^{**}$	$14,81 \pm 4,68^\circ$
Предимплантационная смертность, ед.	$0,10 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,06^{***}$	$0,11 \pm 0,06$
Постимплантационная смертность, ед.	$0,01 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,017$	$0,04 \pm 0,013^{\circ\circ}$

Примечания: * - различия с контрольной группой достоверны ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$; *** - различия с постимплантационной смертностью достоверны ($p < 0,001$); ° - различия с 1 группой вероятны ($p = 0,058$); °° - различия с контрольной группой вероятны ($p = 0,067$).

достоверных различий при введении цитрата свинца - $8,63 \pm 0,80$. Такая ситуация обусловлена достоверным увеличением общей эмбриональной смертности по сравнению с контрольной группой и тенденцией к увеличению показателей эмбриональной смертности по сравнению с группой, получавшей цитрат свинца - $24,05 \pm 1,33\%$, $11,11 \pm 4,43\%$ и $14,81 \pm 4,68\%$ соответственно. При этом введение органической формы свинца характеризуется тенденцией к увеличению постимплантационной смертности по сравнению с контрольной группой.

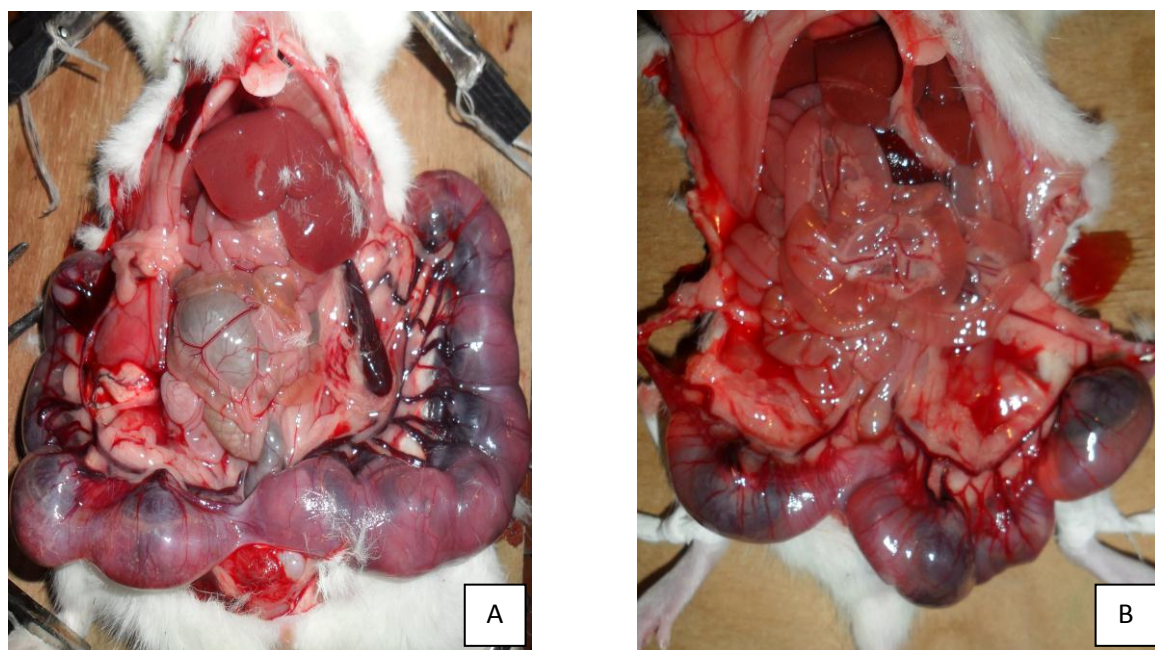


Рис. 1. Фотография двураздельной матки беременной самки крысы контрольной (А) группы и опытной группы, получавшей ацетат свинца (В). Количество эмбрионов в рогах матки экспериментальной группы существенно ниже

Показатели предимплантационной смертности во всех группах в 2,8-11,5 раз выше по сравнению с постимплантационной смертностью, хотя данные отличия достоверными только для группы, получавшей ацетат свинца - $0,23 \pm 0,06$ ед. и $0,02 \pm 0,017$ ед. соответственно. Такая ситуация может быть обусловлена компенсаторно-приспособительными реакциями организма во время беременности на фоне влияния ксенобиотиков. Энергетически для самки крысы более выгодно аборттировать плоды в начальный период беременности по сравнению с периодом интенсивного органогенеза, что нашло подтверждение и в других исследованиях [8]. При этом в этиопатопатогенезе токсического действия свинца существенное значение принадлежит оксидативному стрессу [11], а также нарушению взаимосвязи между

гипоталамусом, гипофизом и гонадами, увеличению возбудимости матки, что, в свою очередь, обуславливает повышение частоты резорбций и внутриутробной гибели плодов [9].

Соотношение полов в исследуемых группах оказались практически одинаковыми (рис. 2), за исключением тенденции к увеличению количества самок в группе, получавшей ацетат свинца – $56,67 \pm 5,35\%$ ($p=0,061$), что подтверждают и результаты исследований других ученых [3]. Такая ситуация, возможно, обусловлена большей чувствительностью плодов мужского пола к внутриутробному воздействию ксенобиотиков, в частности, неорганической формы свинца.

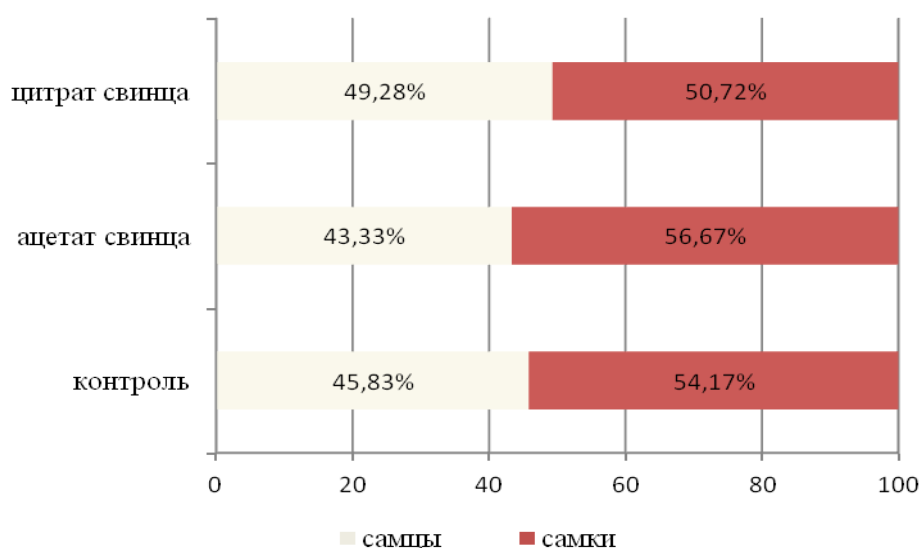


Рис. 2. Соотношение полов в последе в опытных и контрольной группах, %

Видимых пороков развития плодов в исследуемых группах по сравнению с контрольной не обнаружено, за исключением незначительного количества подкожных геморрагий (рис. 3), число которых находится в биологических пределах [2].

Показатели массы и диаметра тела плодов в опытных группах, получавших органическую и неорганическую формы свинца, существенно не отличались от показателей контрольной группы (табл. 2), хотя в группе, получавшей ацетат свинца, они по всем показателям ниже. Краниокаудальный размер плодов у животных первой опытной группы характеризуется тенденцией к снижению по сравнению с контрольной группой – $30,17 \pm 0,40$ и $31,21 \pm 0,37$ мм соответственно, что обусловлено достоверным снижением краниокаудального размера плодов мужского пола – $30,11 \pm 0,44$ и $31,61 \pm 0,46$ мм соответственно ($p < 0,05$).

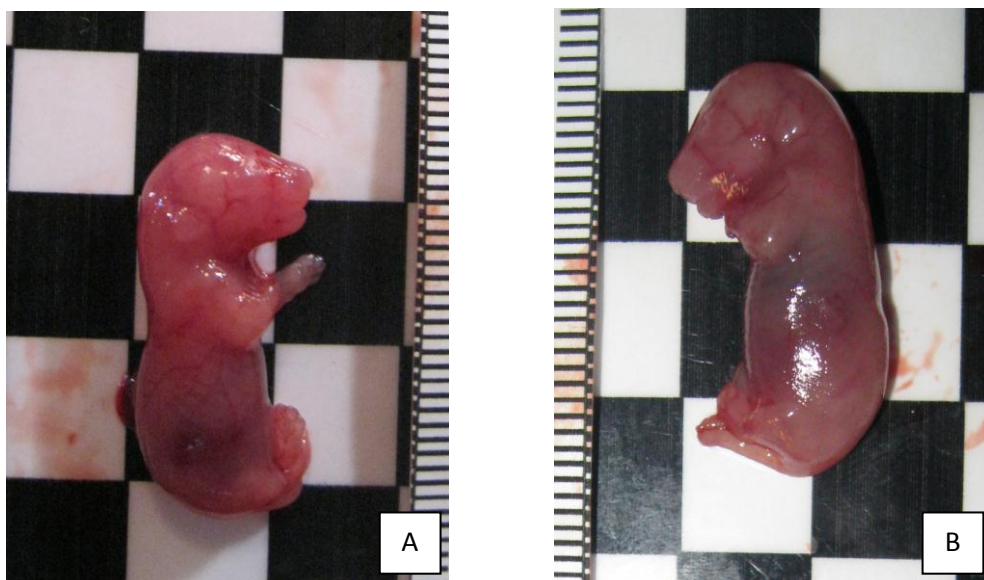


Рис. 3. Подкожные геморрагии у плодов контрольной группы (А) и группы, получавшей ацетат свинца (В)

Полученные нами данные совпадают с результатами исследований других ученых [9], согласно которым внутрижелудочное введение нитрата свинца в дозе 0,0015 мг/кг в течение

Таблица 2

Соматометрические показатели плодов ($M \pm m$)

Показатели	Группа животных		
	контрольная	ацетат свинца (1 группа)	цитрат свинца (2 группа)
Масса тела плодов в среднем, г	2,38 \pm 0,08	2,21 \pm 0,17	2,47 \pm 0,09
Масса тела самца, г	2,43 \pm 0,03	2,20 \pm 0,25	2,53 \pm 0,11
Масса тела самки, г	2,34 \pm 0,10	2,19 \pm 0,24	2,37 \pm 0,14
Краниокаудальный размер плодов в среднем, мм	31,21 \pm 0,37	30,17 \pm 0,40°	31,14 \pm 0,56
Краниокаудальный размер самца, мм	31,61 \pm 0,46	30,11 \pm 0,44*	31,67 \pm 0,54
Краниокаудальный размер самки, мм	30,89 \pm 0,63	30,56 \pm 0,50	30,57 \pm 0,48
Диаметр тела плодов в среднем, мм	10,85 \pm 0,27	10,73 \pm 0,30	10,93 \pm 0,36
Диаметр тела самца, мм	11,00 \pm 0,51	10,33 \pm 0,22**	10,87 \pm 0,31
Диаметр тела самки, мм	10,72 \pm 0,27	11,00 \pm 0,22	11,00 \pm 0,18

Примечания: * - различия с контрольной группой достоверны ($p < 0,05$); ** - различия по сравнению с самками достоверны ($p < 0,01$); ° - различия с контрольной группой вероятны ($p = 0,051$).

всего срока беременности приводило к снижению соматометрических показателей - рождению плодов с низкой массой тела по сравнению с интактной группой. При этом в группе, получавшей ацетат свинца, в отличие от группы, получавшей цитрат свинца и контрольной группы, соматометрические показатели развития самцов ниже по сравнению с самками, особенно диаметр тела - $10,33 \pm 0,22$ и $11,00 \pm 0,22$ мм соответственно, что, вместе с вышеуказанными данными может свидетельствовать о более выраженном негативном влиянии свинца на формирование и внутриутробное развитие плодов мужского пола.

Таким образом, проведенные исследования выявили особенности эмбриотоксического действия низких доз свинца в эксперименте и сравнительные аспекты его токсичности в неорганической форме и в виде цитрата свинца, полученного с использованием нанотехнологий.

Выводы

1. Свинец в дозе 0,05 мг/кг негативно влияет на антенатальное развитие потомства экспериментальных животных, что проявляется в увеличении эмбриолетальности и ухудшении соматометрических показателей плодов.
2. Неорганические соединения свинца характеризуются более выраженным эмбриотоксическим действием по показателям общей эмбриональной смертности, особенно в предимплантационный период, и общему развитию плодов, в то время как воздействие цитрата свинца обуславливает увеличение уровня постимплантационной смертности.
3. Низкие дозы свинца снижают удельный вес самцов в помете и ухудшают их соматометрические показатели как по сравнению с группой контроля, так и по сравнению с самками, что позволяет предположить большую чувствительность плодов мужского пола к внутриутробному воздействию свинца.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Білецька Е.М. Важкі метали навколишнього середовища як фактор гіпофертильності чоловіків (огляд) / Е.М.Білецька, Н.М.Онул, Т.А.Головкова // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2011. - Т.15, №1. – С.9-13.
2. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития / А.А. Динерман. – М.: Медицина, 1980. – 191 с.
3. Коршун М.М. Вивчення ембріотоксичної дії малих доз іонізуючої радіації та хімічних забруднювачів ґрунту / М.М. Коршун, І.Г. Анісімова, Л.П. Запривода // Довкілля та здоров'я. – 2002. – №1 (20). - С. 17-22.
4. Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах / [Пішак В.П., Висоцька В.Г., Магалаєс В.М. та ін.]. – Чернівці: Мед. Університет, 2006.- 350 с.
5. Лазаренко І.А. Накопичення наночасток свинцю в організмі щурів / І.А. Лазаренко, Н.М. Мельникова, В.І. Максін // Сучасні проблеми токсикології. -2011.- №5.-С.60-61.
6. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- і мікроелементів / [Сердюк А.М., Гуліч М.П., Каплуненко В.Г., Косінов М.В.] // Журнал АМН України. – 2010. – Т.16, №1. – С. 107-114.
7. Сердюк А.М. Екологія довкілля та безпека життєдіяльності населення у промислових регіонах України / А.М. Сердюк, В.П.Стусь, В.І.Ляшенко // Дніпропетровськ : «Пороги», 2011. – 486 с.
8. Скальный А.В. Биоэлементы и показатели эмбриональной смертности лабораторных крыс / А.В. Скальный, С.В. Залавина, С.В. Ефимов // Вестник ОГУ. – 2006. - №2. – С. 78-81.
9. Суркова О.А. Эмбриотоксическое и тератогенное действие свинца на потомство крыс, подвергшихся экспозиции в период беременности и лактации / О.А.Суркова, З.Г. Бияшева, М.К. Мурзахметова. - [Электронный ресурс]. Режим доступа: // http://www.rusnauka.com/DN2006/Medecine/6_surkova.doc.htm.
10. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин / [Сердюк А.М., Белицкая Э.Н., Паранько Н.М., Шматков Г.Г.] – Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2004. – 148 с.
11. Experimental study on the effect of vitamin C administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to chlorpyrifos and lead acetate / [Nisar Ahmad Nisar, Mudasar Sultana, Hina Ashraf Waiz et al.] // Vet. World. – 2013. – Vol. 6(8). – P. 461 - 466.
12. Shotyk W. Biogeochemistry and cycling of lead / W. Shotyk, G. Le Roux // Met. Ions. Biol. Syst. – 2005. Vol. 43. – P. 239-275.

Резюме.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА В
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМЕ И В ВИДЕ ЦИТРАТА, ПОЛУЧЕННОГО С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИЙ**

Белецкая Э.Н., Онул Н.М.

В статье представлены результаты изучения влияния соединений свинца в неорганической форме и в виде цитрата, полученного с использованием нанотехнологий, на эмбриогенез в условиях лабораторного эксперимента. Установлено, что свинец в дозе 0,05 мг/кг при воздействии на протяжении всего периода беременности обуславливает нарушение антенатального развития потомства, что проявляется в увеличении эмбриолетальности и ухудшении морфометрических показателей плодов. Неорганические соединения свинца оказывают более выраженное эмбриотоксическое действие по сравнению с наноаквахелатной формой металла по уровню общей эмбриональной смертности, особенно в предимплантационный период и соматометрическим показателям плодов, в то время как воздействие последнего обуславливает увеличение показателей постимплантационной смертности. При этом плоды мужского пола характеризуются большей чувствительностью к внутриутробному воздействию свинца по сравнению с самками.

Summary.

**COMPARATIVE ASPECTS OF LEAD EMBRYOTOXICITY IN AN INORGANIC FORM
AND AS A CITRATE, RECEIVED BY NANOTECHNOLOGY**

E.N.Beletskaya, N.M.Onul

The article presents results on the effect of lead compounds in the inorganic form and as a citrate, received by nanotechnology, on the embryogenesis in a laboratory experiment. It is revealed, that lead in a dose of 0.05 mg/kg when exposed during pregnancy causes disturbance of prenatal development of offspring, which is manifested in increasing fetal mortality and deteriorating of morphometric parameters of fetuses. Inorganic lead compounds have a more pronounced embryotoxic effect than lead citrate according to the level of a total embryonic mortality, particularly in pre-implantation period and somatometric indices of fetuses, while lead citrate causes increase of postimplantation mortality indices. This male fetuses have higher sensitivity to the prenatal influence of lead compared to females.